

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

## KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication  
number:

1020020028435 A

(43)Date of publication of application:  
17.04.2002

(21)Application number: 1020000059443

(22)Date of filing: 10.10.2000

(71)Applicant:

LG CHEM INVESTMENT,  
LTD.

(72)Inventor:

HAN, GYU BEOM  
KIM, JIN HUN  
LEE, JAE YEONG  
MUN, TAE SEOK

(51)Int. Cl

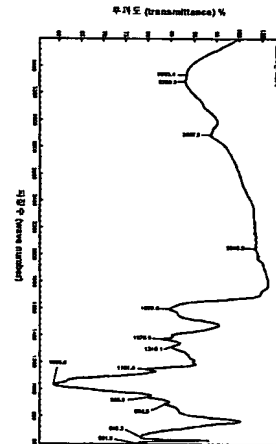
C08B 37/08

(54) CROSSLINKED AMIDE DERIVATIVE OF HYALURONIC ACID AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a water-insoluble crosslinked amide derivative of hyaluronic acid, which can be used for a film for preventing adhesion after an operation, a wrinkle curing agent, and an auxiliary for a plastic surgery.

CONSTITUTION: The crosslinked amide derivative of hyaluronic acid is produced by crosslinking the hyaluronic acid or cation salts thereof with a polymer or an oligomer having at least two amine groups by an amidation in the presence of an activator of a carboxyl group, wherein the polymer or the oligomer is selected from the group consisting of chitosan, chitosan derivatives, deacetylated hyaluronic acid or cation salts thereof, peptide having at least two reactive amine groups, and protein. The ratio of carboxyl group of the hyaluronic acid or the cation salts thereof and the amine groups of the polymer or the oligomer is 1:0.01-100.



&amp;copy; KIPO 2002

## Legal Status

Date of final disposal of an application (20030224)

Patent registration number (1003752990000)

Date of registration (20030225)

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 7  
C08B 37/08

(11) 공개번호 특2002-0028435  
(43) 공개일자 2002년04월17일

(21) 출원번호 10-2000-0059443  
(22) 출원일자 2000년10월10일

(71) 출원인 주식회사 엘지씨아이  
성재갑  
서울시영등포구여의도동20번지

(72) 발명자 문태석  
경기도구리시인창동일신건영아파트703동1804호  
이재영  
서울특별시구로구개봉1동109-16호  
김진훈  
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트304동604호  
한규범  
대전광역시유성구신성동럭키하나아파트102동1002호

(74) 대리인 조인제

심사청구 : 있음

(54) 히알루론산의 가교결합형 아마이드 유도체와 이의 제조방법

요약

본 발명은 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머가 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합하는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는 수술후 유착방지용 필름, 주름살 치료제, 성형보조물 등 다양한 용도로 사용될 수 있다.

대표도  
도 1

색인어  
가교된 히알루론산 유도체, 아마이드화 반응, 카르보디이미드

명세서

## 도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 3의 표 2의 샘플 < 가 > 에 대한 적외선 흡수 스펙트럼이다.

도 2은 실시예 3의 표 2의 샘플 < 나 > 에 대한 적외선 흡수 스펙트럼이다.

도 3은 실시예 3의 표 2의 샘플 < 다 > 에 대한 적외선 흡수 스펙트럼이다.

도 4은 실시예 3의 표 2의 샘플 < 라 > 에 대한 적외선 흡수 스펙트럼이다.

도 5은 키토산으로 가교한 HA 유도체의 구조와 그 합성과정에 대한 도식도이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 히알루론산의 가교결합형 아마이드 유도체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 구체적으로는 다양한 분자량의 히알루론산 또는 그 양이온염과 다양한 분자량의 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머를 아마이드화 반응을 통해 교차결합시키는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

히알루론산(이하 HA 라 함)은 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루쿠론산으로 이루어진 반복 단위가 선형으로 연결되어 있는 생체 고분자 물질로, 안구의 유리액, 관절의 활액, 닭벼슬 등에 많이 존재한다. 여기서 HA 라는 용어는 히알루론산과 그의 양이온염을 모두 지칭하는 말이다. 본 발명의 히알루론산의 양이온염은 예를들면 히알루론산의 나트륨염, 칼륨염 등의 무기염과 히알루론산의 테트라부틸암모늄염 등의 유기염을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 본 발명의 히알루론산의 양이온염은 히알루론산의 나트륨염이다.

HA 유도체는 수술후 유착방지용 필름, 주름살 치료제, 성형 보조물 등 여러 가지 용도로 개발되고 있다. HA 유도체는 물에 대한 용해도에 따라 가용성 유도체와 불용성 유도체로 크게 나눌 수 있다. 불용성 유도체의 경우, 그 합성 방법을 크게 두 가지로 나누어 생각할 수 있는데, 하나는 작용기가 하나인 화합물을 HA 에 반응시켜 HA 의 선형사슬에 이 화합물을 결합시키는 것이고, 다른 하나는 작용기가 둘인 화합물을 HA와 반응시켜 교차결합된 HA를 만드는 것이다.

디비닐술폰, 비스에폭사이드, 비스할라이드, 포름알데히드 등의 작용기가 두개인 화합물을 사용하여 교차결합된 불용성 HA 유도체를 합성한 예가 여러 문헌에 보고되었다. 미국 특허 제4,582,865호에서 HA 의 가교를 위해서 디비닐술폰이 사용된 것이 보고되었으며, 미국 특허 제4,713,448호에서는 포름알데히드를 이용하여 가교반응을 수행한 것이 보고되었다. 국제 출원 제86/00912호에서는 두개 이상의 에폭시기를 가지고 있는 화합물을 이용하여 카르복시기를 함유하는 여러 다당류의 가교에 이용한 예가 보고되었다.

HA 의 카르복시기를 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)를 이용하여 수용액상에서 활성화시킨 후, 작용기가 하나인 아민과 반응시켜 아마이드 결합을 형성시키면 물에 대한 용해도가 감소한다는 보고가 있다 (미국 특허 제4,937,270호 참조). 또한 EDC 를 이용하여 여러 가지 다가음이온 다당류와 HA 를 교차결합시킨 예도 보고되었다(미국 특허 제5,017,229호 참조).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은, 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머가 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합된 것을 특징으로 하는 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 히알루론산의 가교결합형 아마이드 유도체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 상기 유도체는 다양한 분자량의 히알루론산 또는 그 양이온염과 다양한 분자량의 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머를 아마이드화 반응을 통해 교차결합한 유도체일 수 있다. 바람직한 구체예로서 상기 고분자 또는 올리고머는 다가양이온 고분자 또는 올리고머일 수 있다. 본 발명의 가교된 히알루론산 유도체는 점탄성이 매우 우수하여 여러 가지 용도로 응용 가능하다. 또한 본 발명의 가교된 히알루론산 유도체는 스폰지나 고무와 같은 특징을 가질 수도 있다.

특히 본 발명은 바람직하게는 아민기가 두개 이상 존재하는 다가양이온 고분자 또는 올리고머를 HA의 카르복시 음이온과의 정전기적 인력을 이용하여, 반응에 참여하는 두 작용기가 매우 근접한 위치에 존재하도록 해줌으로써, 반응의 속도를 증대시키고 높은 반응 수율을 얻을 수 있다는 특징을 가지고 있다. 또한 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머와 히알루론산 또는 그 양이온염의 물리적 결합, 즉 이온 결합 상태를 유지하는 것이 아니라 아마이드 결합을 통한 공유결합을 형성함으로써 본 발명의 가교된 히알루론산 유도체는 생체내 여러 조건, 즉 고염분, 낮은 pH의 조건에서도 견디는 생체 재료라는 특징을 가지고 있다. 그리고 EDC를 이용하여 HA의 교차결합을 통해 얻어진 불수용성인 기존의 물질들과 전혀 다른 물성을 지닌 새로운 생체재료라 할 수 있다. 본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는, 기존의 히알루론산 유도체가 생체내에서 쉽게 분해되고 산 등의 가혹 조건에서 쉽게 용해된다는 단점을 극복한 새로운 구조의 물질이며, 높은 점탄성을 보이는 우수한 물성의 생체 적합성 재료라는 특징을 가지고 있다.

즉, 본 발명은 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머가 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합된 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공한다. 상기에서 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머는, 상기 고분자 또는 올리고머 전체당 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명은 상기 가교된 히알루론산 유도체에 있어서, 상기 고분자 또는 올리고머가, 분자 내부에 수소 이온을 받아들일 수 있는 아민기를 가지고 있어 산성 또는 중성 조건에서 양전하를 가지는 고분자 또는 올리고머이고, 카르복시기의 활성화제의 존재하에서 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시켜서 제조된 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 상기 가교된 히알루론산 유도체에 있어서, 반응에 참여하는 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기 대 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기의 비율 1 : 0.01 ~ 100으로 하여 제조된 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공한다. 또한 바람직하게는, 카르복시기의 활성화제의 존재하에서 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머가 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합된 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공한다. 본 발명은 또한 바람직하게는, 상기 가교된 히알루론산 유도체에 있어서, 상기 반응이 산성 또는 중성 조건하에서 수행되고, 상기 고분자 또는 올리고머는 그 안에 존재하는 아민기가 수소 이온과 결합하여 양전하를 지니는 다가양이온 고분자 또는 올리고머이며, 상기 다가양이온 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시켜서 제조된 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체를 제공한다.

또한, 본 발명은 카르복시기의 활성화제의 존재하에서 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머를 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인

가교된 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 상기 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법에 있어서, 상기 고분자 또는 올리고머로서, 분자 내부에 수소 이온을 받아들일 수 있는 아민기를 가지고 있어 산성 또는 중성 조건에서 양전하를 가지는 고분자 또는 올리고머를 사용하고, 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 상기 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법에 있어서, 반응에 참여하는 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기 대 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기의 비를 1 : 0.01 ~ 100 으로 하여 반응시키는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다. 또한 바람직하게는, 상기 가교된 히알루론산 유도체에 있어서, 상기 반응을 산성 또는 중성 조건하에서 수행하고, 상기 고분자 또는 올리고머는 그 안에 존재하는 아민기가 수소 이온과 결합하여 양전하를 지니는 다가양이온 고분자 또는 올리고머이며, 상기 다가양이온 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법을 제공한다.

상기 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머의 예로서는, 아민기가 두개 이상 존재하는, 자연계에 존재하는 물질 및 이 물질을 이용하여 합성한 물질 또는 그 유도체인 고분자 또는 올리고머를 들 수 있다. 상기 고분자의 분자량은 바람직하게는 3,000 내지 10,000,000 정도이고, 상기 올리고머의 분자량은 바람직하게는 300 내지 3,000 정도이다.

더구나, 본 발명은 바람직하게는 히알루론산 수용액과 아민기가 2개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머 수용액을 혼합하여 정전기적 인력을 유도한 뒤, 근접해 있는 두 작용기, 즉 카르복시음이온과 아민 양이온을 카르복시기의 활성화제를 이용하여 반응시켜 물에 불용성인 생체재료를 합성한 뒤, 물과 산 수용액 등으로 세척하여 정제한 물질만을 분리한 뒤 건조하는 과정을 포함하는 것이다. 이 과정의 특징은 반응이 용이하고 분리 공정이 간단하며 유해성 유기용매를 사용하지 않는다는 데에 있다.

본 발명의 반응시 첨가되는 상기 카르복시기의 활성화제, 즉 카르복시기의 활성화를 위한 물질의 예로서는 카르보디이미드(carbodiimide)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 카르보디이미드는 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), EDC와 유사한 구조를 가진 1-알킬-3-(3- 디메틸아미노프로필)카르보디이미드들, ETC (1-ethyl-3-(3-(trimethylammonio)propyl) carbodiimide), CMC (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide) 등 물에 잘 녹는 화합물에서 선택될 수 있다.

좀더 바람직하게는, 본 발명의 반응시 상기 반응의 보조제를 임의로(optionally) 첨가할 수 있다. 물에 녹을 수 있고, 활성(active) 에스테르를 형성할 수 있는 물질이면 모두 상기 반응의 보조제로서 사용될 수 있으며, 상기 반응 보조제의 바람직한 예로서는 NHS (N-Hydroxysuccinimide), HOBt (1-hydroxybenzotriazole), HOObt (3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine), HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazole), Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 등에서 선택되는 화합물 등이 있다.

NHS와 같은 반응의 보조제를 사용한 경우 사용하지 않았을 경우에 비하여, 수득된 가교된 히알루론산 유도체의 물성에는 별 차이가 없었으나, N-아실우레아와 같은 부산물의 생성이 감소했다.

카르복시기의 활성화를 위해, 본 발명의 바람직한 구체예에서, 반응시 EDC를 0.0001 ~ 100 mg/ml 가 되도록, NHS를 0 ~ 100 mg/ml 가 되도록 첨가할 수도 있다.

본 발명의 가교된 히알루론산 유도체 및 제조방법에서 사용된 히알루론산 또는 그 양이온염의 분자량은 10,000 ~ 10,000,000의 범위인 것이 바람직하고, 또 반응시 히알루론산 또는 그 양이온염의 농도가 0.01 mg/ml ~ 100 mg/ml 이 되도록 하여 반응시키는 것이 바람직하다.

본 발명의 가교된 히알루론산 유도체 및 제조방법에서 사용된 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머의 예로서는 키토산, 키토산 유도체, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염의 유도체, 반응할 수 있는 아민기가 둘 이상인 펩티드 및 단백질 등 수소 이온을 받을 수 있는 아민기를 다량 함유한 물질이 바람직하다.

본 발명의 가교된 히알루론산 유도체 및 제조방법에서 사용된 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머는 pH 2 ~ 8의 수용액에 용해 가능한 물질이 바람직하다.

본 발명의 반응에 사용되는 바람직한 용매의 예로는 물, 완충수용액 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 상기 반응시 온도는 0 ~ 40℃이 바람직하고, 실온이 더 바람직하다. 본 발명의 상기 반응시 pH는 2 ~ 8 이 바람직하며, 4 ~ 6 이 더 바람직하다. 본 발명의 상기 반응시 반응시간은 0.5 ~ 20 시간이 통상적이며, 2 시간 정도가 바람직하다.

본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는 젤(gel), 막, 비드 및 메쉬(mesh) 등의 형태를 지니도록 제조될 수 있다.

본 명세서내 각 반응에서, 생성물은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 의하여 반응계로부터 분리 및/또는 정제될 수 있다. 분리 및 정제방법의 예로는, 증류(대기압하 증류 및 감압증류를 포함), 재결정, 칼럼 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 상 분리, 용매 추출, 세척 등을 이용할 수 있다. 정제는 각 반응후마다, 또는 일련의 반응 후에 수행할 수 있다.

본 발명의 유도체의 합성을 위해 필요한 출발물질 및 시약은 문헌의 방법에 의해 또는 전술한 방법에 의해 용이하게 제조가능하거나, 상업적으로 구입가능하다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예

##### 실시예 1 : 키토산으로 가교한 HA 유도체의 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이상) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 상기 히알루론산 나트륨 수용액을 교반시키면서 여기에 상기 키토산-염산 수용액을 첨가했다. 키토산-염산 수용액이 첨가되면 키토산-히알루론산 침전이 생성되었다. 두 수용액이 완전히 혼합된 후 pH는 4 ~ 5가 되었다. 여기서 교반을 잘 해주면서 EDC 및 NHS를 다음 표 1과 같은 농도로 천천히 첨가해주었다. 첨가 후 25℃에서 2시간 동안 반응시켰다.

[표 1]

군	EDC		NHS	
	농도 (mg/ml)	[EDC]/[HA의 COOH]	농도 (mg/ml)	[NHS]/[HA의 COOH]
A	0	0	0	0
B	0.2	1/3	0.24	2/3
C	0.4	2/3	0.48	4/3
D	0.6	1	0.72	2
E	1.2	2	1.44	4

표 1 에서 EDC와 NHS를 첨가하지 않은 샘플, 즉 키토산과 히알루론산이 이온 결합의 형태로 침전되어 있는 샘플이, 높은 염 농도에서 또는 낮은 pH에서 물에 용해되는 점에 착안하여, 이 샘플이 완전히 용해될 때까지 1N HCl 을 서서히 첨가해주었다. 이 첨가에는 30분 정도 소요되었으며, 100 ml 반응액에 1N HCl 3ml 정도가 필요했다. 나머지 샘플들 (EDC 와 NHS를 첨가해준 샘플들)도 같은 조건으로 처리하여, 키토산과 히알루론산이 아마이드 결합을 이루지 못하고 단순히 이온 결합 형태로 침전되어 있는 미반응 부분을, 아마이드 결합을 통해 키토산으로 가교된 HA 유도체로부터 제거해낼 수 있었다. 산처리에도 용해되지 않고 남은 부분을 다량의 물로 세척하여 미반응 EDC 나 NHS, 그리고 이들의 반응 부산물을 완전히 제거한 후, 이를 25℃ 에서 진공 건조시켰다. 이와 같은 과정을 통해 물에 불용성인 키토산으로 가교된 HA 유도체를 얻을 수 있었다. EDC 와 NHS를 많이 첨가한 샘플일수록 최종적으로 더 많은 양의 생성물을 얻을 수 있었으며, 각 군에 대하여 수득한 키토산으로 가교된 HA 유도체의 양은 다음과 같았다: B 군, 49%; C 군, 58%; D 군, 71%; E 군, 77%.

#### 실시예 2 : 키토산으로 가교한 HA 유도체의 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이하) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 이 두 물질을 실시예 1과 동일한 과정으로 반응시키고 정제하여 물에 불용성인 키토산으로 가교된 HA 유도체를 얻을 수 있었다. 실시예 1 에서와 마찬가지로 EDC 와 NHS를 많이 첨가한 샘플일수록 최종적으로 더 많은 양의 생성물을 얻을 수 있었으며, 각 군에 대하여 수득한 키토산으로 가교된 HA 유도체의 양은 다음과 같았다: B-1 군, 53 % ; C-1 군, 62 % ; D-1 군, 69 % ; E-1 군, 77 %.

#### 실시예 3 : 키토산으로 가교한 HA 유도체의 산과 고염분에 대한 내성 시험 및 키토산으로 가교한 HA 유도체의 아마이드 결합 확인

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 상기 히알루론산 나트륨 수용액을 교반시키면서 여기에 상기 키토산-염산 수용액을 첨가했다. 키토산-염산 수용액이 첨가되면 키토산-히알루론산 침전이 생성되었다. 두 수용액이 완전히 혼합된 후 pH는 4 ~ 5가 되었다. 여기에 교반을 잘 해주면서 EDC 와 NHS를 다음 표 2와 같은 농도로 천천히 첨가해주었다. 첨가 후 25℃에서 2시간 동안 반응시켰다.

반응 후 산처리를 하지 않고 다량의 물로 여러 번 세척하여 생성물을 정제한 후 진공 건조시키면 이온 결합으로 침전된 키토산-HA 복합체도 함께 혼합되어 최종 생성물에 남는다. EDC 및 NHS 를 첨가한 경우(샘플 < 가> , < 나> , < 다> )에는 실시예 1과 같은 과정으로 산처리를 하여 정제를 하여 생성물들을 수득하였고, EDC 및 NHS 를 첨가하지 않은 경우(샘플 < 라> )에는 산처리를 하지 않고 정제를 하여 이온결합으로 침전된 키토산-HA 복합체(샘플 < 라> )를 얻었다. 이들을 진공 건조시킨 후 0.1N 염산 수용액에 각 샘플이 0.02 %(w/v)가 되도록 분산시킨 후 완전히 용해되는 데에 걸리는 시간을 측정하여 하기 표 2 에 나타내었다.

[표 2]

샘플	EDC (mg/ml)	NHS (mg/ml)	완전히 용해되는데 걸린 시간
< 가 >	1.2	1.44	120 시간 이상
< 나 >	0.6	0.72	120 시간 이상
< 다 >	0.2	0.24	80 시간
< 라 >	0	0	1 시간 이내

표 2의 샘플에 대해서 1N 염산 수용액에 대한 양상을 알아보기 위해 1 % (w/v)가 되도록 1N 염산 수용액에 샘플을 분산시킨 후 교반하면서 24 시간 후에 각 샘플 용액을 관찰하여 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

샘플	1N HCl(수용액)내에서 24시간 방치했을 때의 1% (w/v) 각 샘플의 양상
< 가 >	용액 전체에 불투명한 작은 입자들이 용해되지 않고 분산되어 있음
< 나 >	불투명한 겔과 투명한 겔이 공존하며 용액을 이룸.
< 다 >	전체적으로 투명한 용액을 이루었으나 아주 미세한 입자들이 관찰됨.
< 라 >	완전히 용해되어 투명한 용액을 형성함.

또한 표 2의 샘플들의 고염분에 대한 내성을 알아보기 위해서, 1N 염화나트륨 수용액에 1 (w/v)%가 되도록 상기 표 2의 샘플들을 첨가한 후에 교반하면서 그 양상을 살펴본 결과, < 라 > 샘플의 경우만 30 분내에 침전이 완전히 녹으면서 투명한 상태로 되었으며, 나머지 샘플들은 10 일 이상 형태를 그대로 유지하였다. 이 결과는, < 가 >, < 나 >, < 다 > 샘플들이 키토산과 HA 사이의 이온결합에 의한 물리적 복합체 형태로 존재하는 것이 아니라, 공유 결합에 의한 가교를 이루고 있음을 보여주었다.

상기와 같이 제조 및 정제한 후 진공 건조시킨 샘플 < 가 > 내지 < 라 >에 대한 적외선 흡수 스펙트럼을 하기 도 1 내지 4에 제시하였다. 도면에 의하면, 수소 이온을 받은 키토산의 아민과 염을 이룬 HA의 카르복시기의 C=O 스트레치(stretch)에 의한  $1728.6\text{ cm}^{-1}$  부근의 피크가 가교 반응이 많이 진행될수록 상대적으로 감소함을 알 수 있었다(도 1 내지 4 참조). 또한, 수소 이온을 받은 키토산의 일차 아민의 변형(deformation)에 의한  $1557.5\text{ cm}^{-1}$  부근의 피크가 가교 반응이 진행될수록 상대적으로 감소하여 샘플 < 가 >에 이르러서는 쇼울더(shoulder) 형태로만 남아 있음을 알 수 있었다(도 1 내지 4 참조). 이 결과는, 염을 이루고 있던 두 작용기, 즉 아민기와 카르복시기가 반응을 하여 그 양이 감소함을 보여주는 것이며, 아마이드의 C=O 스트레치(stretch)에 의한  $1600.6\text{ cm}^{-1}$  부근의 피크가 가교 반응이 진행될수록 상대적으로 증가하는 사실과 부합된다(도 1 내지 4 참조). 일반적으로 가교가 진행될수록 수소 결합이 증가하고, 이에 따라 아마이드의 C=O 스트레치(stretch)에 의한 피크가 낮은 파장수(wavenumber)로 이동하는 경향을 보이는 것으로 알려져 있는데, 일반적인 아마이드 피크 위치( $1660\text{ cm}^{-1}$  부근, J. Bioactive & Compatible Polymers, 9, 429-447 (1994))보다 낮은 파장수( $1600.6\text{ cm}^{-1}$ )에서 피크가 나타난 사실은, 본 발명에 의한 물질이 가교되었다는 사실과도 부합되었다. 따라서 본 발명에 의한 HA 유도체가 아마이드 결합에 의해 가교되었음을 알 수 있었다. 부반응으로 생길 수 있는 에스테르( $1745 \sim 1760\text{ cm}^{-1}$ )이나 무수카르복시산(anhydride,  $1800\text{ cm}^{-1}$ )의 형성은 스펙트럼상에서 관찰되지 않았다(Silverstein 외 다수, 편집, Spectrometric Identification of Organic Compounds, p. 122~124, 제이. 와일리 & 선즈, 뉴욕 (1981)). 또한 EDC를 사용할 때 많이 생기는 부산물인 N-아실우레아( $1700\text{ cm}^{-1}$ )의 형성도 스펙트럼 상에서 관찰되지 않았다(미국 특허 제5,527,893호 참조).

이 스펙트럼들의 분석결과와 상기 산과 고염분에 대한 내성 시험 결과를 종합하여 키토산으로 가교한 HA 유도체의 구조와 그 합성과정을 도 5에 도식적으로 나타내었다.

실시예 4 : 탈아세틸화된 HA를 이용하여 교차 결합된 HA 유도체의 제조



HA를 높은 pH 또는 낮은 pH 조건에서 온도를 높여주면 사슬의 분해와 함께 탈아세틸화가 진행되어 활성이 큰 아민이 형성된다. 이 아민은 키토산의 경우와 유사한 방법으로 카르복시기와 아마이드 결합을 이룰 수 있다.

HA의 탈아세틸화를 수행하기 위하여, 0.2 ~ 10 N의 NaOH 를 사용하여 HA와 25 ~ 50℃에서 1 ~ 30 시간 동안 반응시켰다. 반응의 종결은 HCl 로 중화시켜 수행하였으며, 투석 후 동결건조를 통해 탈아세틸화된 HA를 얻을 수 있었다. 반응 결과, 생성된 아민의 양을 로쓰(Roth)의 형광계법(fluorimetric method)(Anal. Chem.,1971,43, 880~882 ; J. Chromatogr.,1973,83,353~356;Clin. Chem. Clin. Biochem.,1976,14,361~364 참조)을 이용하여 측정한 후 탈아세틸화도를 구했다. 탈아세틸화도는 다음과 같은 식으로 구했다.

탈아세틸화도 = [생성된 아민의 농도]/[HA의 반복 단위의 농도] x 100(%)

HA의 반복 단위의 농도는 HA 반복 단위에 카르복시기가 하나씩 존재한다는 점에 착안하여 카르복시기를 정량하여 구했다. 카르복시기의 정량은 카르바졸 방법(Anal. Biochem.,1962,4,330)에 의해 수행하였다.

반응 결과, 탈아세틸화도는 1 ~ 40% 가 되었다. 위와 같은 방법으로 얻어낸 탈아세틸화된 HA를 이용하여 교차 결합 반응을 수행하였다. 10 mg/ml의 탈아세틸화된 HA 에 2.4 mg/ml 이 되도록 EDC를, 그리고 2.9 mg/ml 이 되도록 N HS를 넣고 25℃에서 2 시간 동안 반응시키고 정제한 후 진공 건조시켰다. 그 결과 물에 불용성인 젤이 51%의 수득율로 형성되었다. 상기 생성된 물에 불용성인 가교된 HA 유도체의 산과 고염분에 대한 내성 시험결과, 0.1 N 염산 수용액에서 48 시간 이상, 그리고 1 N 염화나트륨 수용액에서 10 일 이상 불용인 상태로 그 형태를 유지하였다. 그 시험방법은 실시예 3과 동일했다.

#### 실시예 5 : 탈아세틸화된 HA로 가교한 HA 유도체의 제조

키토산과 마찬가지로 탈아세틸화된 HA 에도 카르복시기와 반응할 수 있는 다량의 아민기가 존재한다. 이 아민기를 이용하여 실시예 1과 유사한 과정으로 물에 불용성인 HA 유도체를 제조할 수 있었다. 각각 0.5 mg/ml 이 되도록 탈아세틸화된 HA 와 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이상)이 혼합된 수용액을 만든 후, 0.2 mg/ml 이 되도록 EDC 를, 그리고 0.24 mg/ml 이 되도록 NHS를 넣고, 25℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 정제하고 건조시켰다. 그 결과 물에 불용성인 젤이 56 %의 수득율로 형성되었다. 상기 생성된 물에 불용성인 가교된 HA 유도체의 산과 고염분에 대한 내성 시험결과, 0.1 N 염산 수용액에서 48 시간 이상, 그리고 1 N 염화나트륨 수용액에서 10 일 이상 불용인 상태로 그 형태를 유지하였다. 그 시험방법은 실시예 3과 동일했다.

#### 실시예 6 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이상) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 제조한 히알루론산 나트륨 수용액을 유리 플레이트에 붓고 여기에 표 1의 B, C, D, E 군과 같은 다양한 농도로 EDC 와 NHS를 넣어 주었다. 잘 혼합해준 후, 제조한 키토산-염산 수용액을 상기 플레이트에 부어주면 흰색 막이 플레이트에 형성되었다. 이를 건조시켜 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막을 얻을 수 있었다. 각 군에 대하여 수득한 키토산으로 가교된 HA 유도체의 양은 다음과 같았다 : B-2 군, 51 % ; C-2 군, 63 % ; D-2 군, 70 % ; E-2 군, 79 %.

고염분에 대한 내성을 알아보기 위해서, 수득한 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막을 실시예 3 에서와 같이 1N 염화나트륨 수용액내에 1 (w/v)% 가 되도록 첨가한 후에 교반하면서 그 양상을 살펴본 결과, 10 일 이상의 기간 동안 형태를 그대로 유지하였다.

#### 실시예 7 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이하) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 제조한 히알루론산 나트륨 수용액을 유리 플레이트에 붓고 여기에 표 1의 B, C, D, E 군과 같은 다양한 농도로 EDC 와 NHS를 넣어 주었다. 잘 혼합해준 후, 제조한 키토산-염산 수용액을 상기 플레이트에 부어주면 흰색 막이 플레이트에 형성되었다. 이를 건조시켜 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막을 얻을 수 있었다. 각 군에 대하여 수득한 키토산으로 가교된 HA 유도체의 양은 다음과 같았다 : B-3 군, 47 % ; C-3 군, 61 % ; D-3 군, 70 % ; E-3 군, 78 %.

고염분에 대한 내성을 알아보기 위해서, 수득한 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 막을 실시예 3에서와 같이 1N 염화나트륨 수용액내에 1 (w/v)% 가 되도록 첨가한 후에 교반하면서 그 양상을 살펴본 결과, 10 일 이상의 기간 동안 형태를 그대로 유지하였다.

#### 실시예 8 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 비드 제조

실시예 1과 같은 방법으로 제조한 건조된 HA 유도체를 미세하게 갈아 물이나 생리식염수 등에 분산시켰을 때 주사기로 주입 가능한 HA 유도체 비드 용액이 되었다.

#### 실시예 9 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 비드 제조

실시예 2와 같은 방법으로 제조한 건조된 HA 유도체를 미세하게 갈아 물이나 생리식염수 등에 분산시켰을 때 주사기로 주입 가능한 HA 유도체 비드 용액이 되었다.

#### 실시예 10 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 수화된 젤 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이하) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 상기 히알루론산 나트륨 수용액을 교반시키면서 여기에 상기 키토산-염산 수용액을 첨가했다. 여기에 0.2 ~ 1.2 mg/ml 이 되도록 EDC를, 그리고 0.24 ~ 1.44 mg/ml 이 되도록 NHS를 넣고, 25℃에서 2 시간 동안 반응시키고 정제한 후 진공 건조시켰다. 여기서 건조한 HA 유도체 200 ~ 700 mg 을 수득하였다. 상기 건조한 HA 유도체의 질량을 측정하고 물에 48 시간 담가둔 후 겔에 묻은 물기를 잘 닦아낸 후, 증가한 질량을 측정하여 HA 유도체 질량당 물 함유량을 측정하였다. 또한 이 물을 함유한 젤의 유변학적 물성들을 레오미터(rheometer)로 측정하였다. 그 결과 다음과 같은 측정치를 얻을 수 있었다.

함유된 물 질량 / HA 유도체 질량 = 1.5 ~ 3.0

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 저장 모듈러스(storage modulus) = 50 ~ 300 kPa

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 손실 모듈러스(loss modulus) = 8 ~ 50 kPa

이 모듈러스 수치들은 고무와 유사한 범위의 값이다. 이는 본 발명에 의한 물질이 가교된 물질이라는 사실과 부합되는 결과이며, 이 물질이 성형보조물 등으로 사용될 수 있음을 보여준다. 이미 당업계에 공지된 바와 같이 저장 모듈러스가 크다는 것은 탄성이 크다는 것을 의미하며, 손실 모듈러스가 크다는 것은 점성이 크다는 것을 의미한다. 상기 수득한 젤의 저장 모듈러스 및 손실 모듈러스 수치가 크므로, 상기와 같은 방법에 의해 고점탄성을 지닌 수화된 젤 형태인 HA 유도체를 제조할 수 있었다.

# 실시예 11 : 키토산으로 가교한 HA 유도체로 이루어진 수화된 겔 제조

반응시 농도가 1.25 mg/ml 이 되도록 히알루론산 나트륨(분자량 : 2,000,000 이상) 수용액을 제조했다. 또 반응시 농도가 0.625 mg/ml 이 되도록 키토산-염산 수용액을 제조했다. 상기 히알루론산 나트륨 수용액을 교반시키면서 여기에 상기 키토산-염산 수용액을 첨가했다. 여기에 0.2 ~ 1.2 mg/ml 이 되도록 EDC를, 그리고 0.24 ~ 1.44 mg/ml 이 되도록 NHS를 넣고, 25℃에서 2 시간 동안 반응시키고 정제한 후 진공 건조시켰다. 여기서 건조한 HA 유도체 200 ~ 700 mg 을 수득하였다. 상기 건조한 HA 유도체의 질량을 측정하고 이를 물에 담가 48시간 정도 방치하여, 수화된 겔 형태인 HA 유도체를 제조할 수 있었다. 상기 물에 담가둔 수화된 겔 형태의 HA 유도체의 겔에 묻은 물기를 잘 닦아낸 후, 증가한 질량을 측정하여 HA 유도체 질량당 물 함유량을 측정하였다. 또한 이 물을 함유한 겔의 유변학적 물성들을 레오미터(rheometer)로 측정하였다. 그 결과 다음과 같은 측정치를 얻을 수 있었다.

함유된 물 질량 / HA 유도체 질량 = 1.2 ~ 3.0

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 저장 모듈러스 = 60 ~ 330 kPa

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 손실 모듈러스 = 10 ~ 50 kPa

이와 같은 방법으로 고점탄성을 지닌 수화된 겔 형태인 HA 유도체를 제조할 수 있었다.

## 실시예 12 : HA와 키토산의 분자량과 반응시 농도, EDC와 NHS의 농도에 따른 다양한 물성의 가교된 HA 유도체의 제조

다음과 같은 여러 변수들을 조합하여 다양한 물성의 가교된 HA 유도체를 제조할 수 있었다.

히알루론산 나트륨의 분자량

: 300,000 이하 ; 300,000 ~ 3,000,000 ; 3,000,000 이상

반응시 히알루론산의 농도

: 0.02 mg/ml ; 0.1 mg/ml ; 1.0 mg/ml ; 10 mg/ml ; 80 mg/ml

키토산의 분자량을 키토산 수용액의 점도값으로 표시 (1% 아세트산 수용액에 키토산이 1%가 되도록 녹여 브룩필드 점도계로 점도를 측정하였을 때의 점도)

: 저분자량 (20 ~ 200 cps) ; 중간 분자량 (200 ~ 800 cps) ; 고분자량 (800 ~ 2000 cps)

반응시 키토산의 농도(mg/ml)

: 0.005 ; 0.01 ; 0.05 ; 0.1 ; 0.5 ; 1.0 ; 5.0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80

반응시 EDC 의 농도(mg/ml)

: 0.00096; 0.0048; 0.0096; 0.024; 0.048; 0.24; 0.48; 2.4; 3.84; 4.8; 19.2; 38.4; 76.8

반응시 NHS 의 농도(mg/ml)

: 0; 0.000576; 0.001152; 0.001728; 0.00288; 0.00576; 0.00864; 0.01152; 0.0144; 0.01728; 0.0288; 0.0432; 0.0576; 0.0864; 0.144; 0.288; 0.432; 0.576; 0.864; 1.44; 2.304; 2.88; 4.32; 4.608; 5.76; 6.912; 8.64; 11.52; 23.04; 34.56; 46.08; 69.12; 92.16

수득된 키토산으로 가교한 HA 유도체를 이용하여 실시예 10의 방법과 동일한 방법을 사용하여 수화된 겔 형태인 HA 유도체를 제조할 수 있었다. 이 물을 함유한 겔의 유변학적 물성들을 레오미터(rheometer)로 측정한 결과, 다음과 같은 측정치를 얻을 수 있었다.

함유된 물 질량 / HA 유도체 질량 = 1.0 ~ 5.0

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 저장 모듈러스 = 20 ~ 410 kPa

0.01~0.1 Hz의 진동수에서의 손실 모듈러스 = 2 ~ 60 kPa

#### 발명의 효과

본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는 점탄성이 매우 우수하여 여러 가지 용도로 응용 가능하다. 본 발명의 가교된 히알루론산 유도체는 수술후 유착방지용 필름, 주름살 치료제, 성형보조물 등 다양한 용도로 사용될 수 있다.

특히 본 발명은 바람직하게는 아민기가 두개 이상 존재하는 다가양이온 고분자 또는 올리고머의 아민기를 HA의 카르복시 음이온과의 정전기적 인력을 이용하여, 반응에 참여하는 두 작용기가 매우 근접한 위치에 존재하도록 해줌으로써, 반응의 속도를 증대시키고 높은 반응 수율을 얻을 수 있다는 특징을 가지고 있다. 또한 아민기가 2개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머와 히알루론산 또는 그 양이온염의 물리적 결합, 즉 이온 결합 상태를 유지하는 것이 아니라 아마이드 결합을 통한 공유결합을 형성함으로써 본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는, 생체내 여러 조건, 즉 고염분, 낮은 pH의 조건에서도 견디는 생체 재료라는 특징을 가지고 있다. 그리고 EDC를 이용하여 HA의 교차결합을 통해 얻어진 불수용성인 기존의 물질들과 전혀 다른 물성을 지닌 새로운 생체재료라 할 수 있다. 본 발명의 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체는, 기존의 히알루론산 유도체가 생체내에서 쉽게 분해되고 산 등의 가혹 조건에서 쉽게 용해된다는 단점을 극복한 새로운 구조의 물질이며, 높은 점탄성을 보이는 우수한 물성의 생체 적합성 재료라는 특징을 가지고 있다.

더구나, 본 발명은 바람직하게는 히알루론산 수용액과 아민기가 2개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머 수용액을 혼합하여 정전기적 인력을 유도한 뒤, 근접해 있는 두 작용기, 즉 카르복시음이온과 아민 양이온을 카르복시기의 활성화제를 이용하여 반응시켜 물에 불용성인 생체재료를 합성한 뒤, 물과 산 수용액 등으로 세척하여 정제한 물질만을 분리한 뒤 건조하는 과정을 포함하는 것이다. 이 과정의 특징은 반응이 용이하고 분리 공정이 간단하며 유해성 유기용매를 사용하지 않는다는 데에 있다.

상기에서 본 발명은 기재된 구체예를 중심으로 상세히 설명되었지만, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

카르복시기의 활성화제의 존재하에서 아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머를 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

## 청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 또는 올리고머로서, 분자 내부에 수소 이온을 받아들일 수 있는 아민기를 가지고 있어 산성 또는 중성 조건에서 양전하를 가지는 고분자 또는 올리고머를 사용하고,

상기 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

## 청구항 3.

제 2 항에 있어서,

상기 반응을 산성 또는 중성 조건하에서 수행하고,

상기 고분자 또는 올리고머는 그 안에 존재하는 아민기가 수소 이온과 결합하여 양전하를 지니는 다가양이온 고분자 또는 올리고머이며,

상기 다가양이온 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시키는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

## 청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 고분자 또는 올리고머가 키토산, 키토산 유도체, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염의 유도체, 반응할 수 있는 아민기가 둘 이상인 펩티드 및 단백질 등에서 선택되는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

## 청구항 5.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

반응에 참여하는 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기 대 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기의 비율 1 : 0.01 ~ 100 으로 하여 반응시키는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

## 청구항 6.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 히알루론산 또는 그 양이온염으로서 10,000 ~ 10,000,000 의 분자량 범위의 히알루론산 또는 그 양이온염을 사용하고,

반응시 히알루론산 또는 그 양이온염의 농도가 0.01 mg/ml ~ 100 mg/ml 이 되도록 하여 반응시키는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

청구항 7.

제 1 항에 있어서,

상기 카르복시기의 활성화제로서 카르보디이미드(carbodiimide)를 사용하는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

카르보디이미드는 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 등 물에 잘 녹는 화합물에서 선택되고, 반응 보조제로서 NHS (N-Hydroxysuccinimide) 등의 화합물을 임의로 첨가하는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 9.

제 7 항에 있어서,

카르보디이미드는 EDC와 유사한 구조를 가진 1-알킬-3-(3- 디메틸아미노프로필)카르보디이미드들, ETC (1-ethyl-3-(3-(trimethylammonio)propyl) carbodiimide), CMC (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide) 등 물에 잘 녹는 화합물에서 선택되고,

반응 보조제로서 HOBt (1-hydroxybenzotriazole), HOObt (3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine), HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazole), Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 등에서 선택되는 화합물을 임의로 첨가하는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 10.

제 8 항에 있어서,

반응시 EDC를 0.0001 ~ 100 mg/ml 가 되도록, NHS를 0 ~ 100 mg/ml 가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 11.

아민기가 두개 이상 존재하는 고분자 또는 올리고머가 아마이드화 반응을 통해 히알루론산 또는 그 양이온염과 교차결합된 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 12.

제 11 항에 있어서,

상기 고분자 또는 올리고머가, 분자 내부에 수소 이온을 받아들일 수 있는 아민기를 가지고 있어 산성 또는 중성 조건에서 양전하를 가지는 고분자 또는 올리고머이고,

카르복시기의 활성화제의 존재 하에서 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기와 상기 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기와의 정전기적 인력을 이용하여 교차결합 반응을 촉진시켜서 제조된 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 13.

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

상기 고분자 또는 올리고머가 키토산, 키토산 유도체, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염, 탈아세틸화된 히알루론산 또는 그 양이온염의 유도체, 반응할 수 있는 아민기가 둘 이상인 펩티드 및 단백질 등에서 선택되는 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 14.

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

반응에 참여하는 히알루론산 또는 그 양이온염의 카르복시기 대 상기 고분자 또는 올리고머의 아민기의 비를 1 : 0.01 ~ 100 으로 하여 제조된 것을 특징으로 하는,

물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 15.

제 1 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 16.

제 3 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 17.

제 6 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 18.

제 7 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 19.

제 8 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 20.

제 9 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 21.

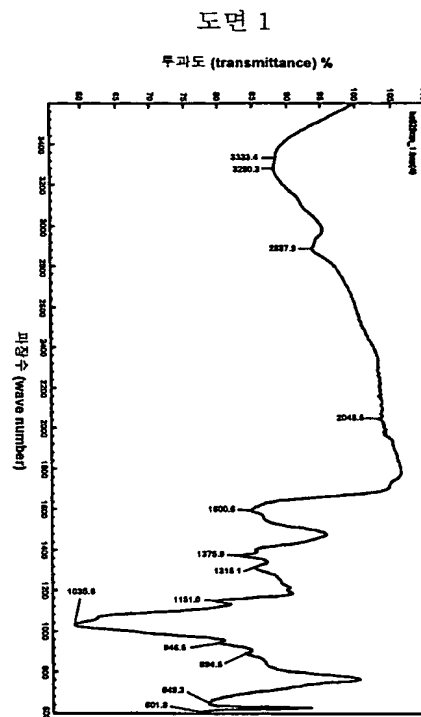
제 10 항의 방법에 의해 제조된 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

청구항 22.

제 11 항에 있어서,

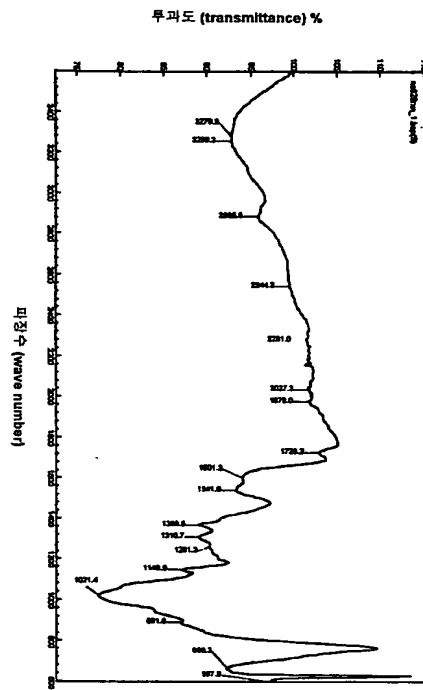
젤, 막, 비드 또는 메쉬(mesh) 등의 형태를 지니는 것을 특징으로 하는, 물에 불용성인 가교된 히알루론산 유도체.

도면

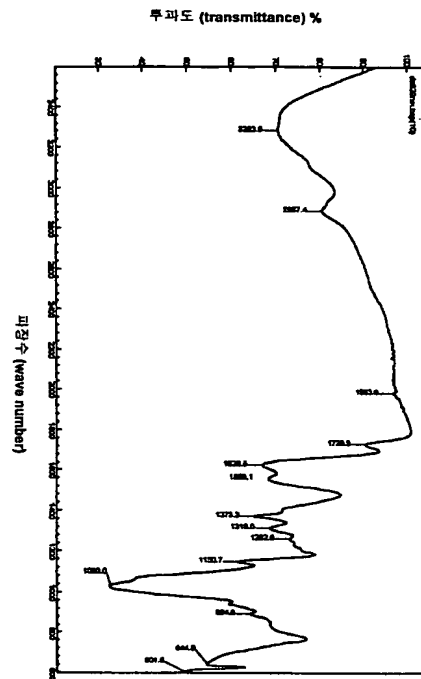




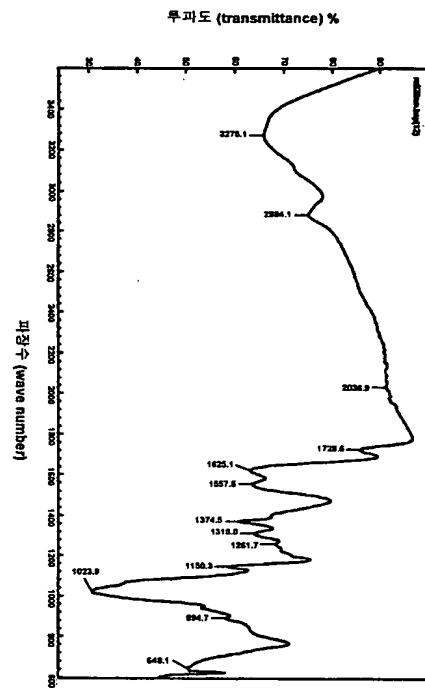
도면 2



도면 3



도면 4



도면 5

